

XP-002177394

AN - 1992-214125 [26]

AP - JP19900268296 19901008

CPY - ASAH

DC - B04 D16

FS - CPI

IC - C12N9/16 ; C12N15/55

MC - B04-B04A1 D05-C02 D05-H04 D05-H12

PA - (ASAH) ASAHI CHEM IND CO LTD

PN - JP4144688 A 19920519 DW199226 C12N15/55 012pp

PR - JP19900268296 19901008

XA - C1992-096981

XIC - C12N-009/16 ; C12N-015/55 ; (C12N-015/55 C12R-001/645) ; (C12N-009/16 C12R-001/645)

AB - J04144688 The following is new: (1) DNA fragment which contains cephalosporin C acetyl-esterase gene derived from Acremonium chrysogenum, where the DNA fragment is regulated with given restriction enzyme map, and (2) recombinant DNA in which DNA fragment of (1) is integrated to vector.

- USE/ADVANTAGE - By using transformed Acremonium chrysogenum with the recombinant DNA, yield of deacetyl cephalosporin C can be increased. Also by destructing cephalosporin C acetyl-esterase gene existing in Acremonium chrysogenum with the DNA fragment, cephalosporin C can also be produced in good efficiency(Dwg.0/0)

C - C12N15/55 C12R1/645 ;

- C12N9/16 C12R1/645

IW - NEW DNA FRAGMENT CONTAIN CEPHALOSPORIN ACETYL ESTERASE GENE TRANSFORM ACREMONIUM CHRYSOGENUM IMPROVE DE ACETYL CEPHALOSPORIN PRODUCE

IKW - NEW DNA FRAGMENT CONTAIN CEPHALOSPORIN ACETYL ESTERASE GENE TRANSFORM ACREMONIUM CHRYSOGENUM IMPROVE DE ACETYL CEPHALOSPORIN PRODUCE

NC - 001

OPD - 1990-10-08

ORD - 1992-05-19

PAW - (ASAH) ASAHI CHEM IND CO LTD

TI - New DNA fragment contg. cephalosporin C acetyl:esterase gene - uses transformed Acremonium chrysogenum to improve de:acetyl cephalosporin prodn.

AN

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-144688

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)5月19日

C 12 N 15/55
 // C 12 N 9/16
 (C 12 N 15/55
 C 12 R 1:645)
 (C 12 N 9/16
 C 12 R 1:645)

ZNA

Z

7823-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全12頁)

⑭ 発明の名称 新規DNA化合物

⑰ 特 願 平2-268296

⑱ 出 願 平2(1990)10月8日

⑲ 発 明 者 松 田 昭 生 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内
 ⑲ 発 明 者 杉 浦 弘 吉 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内
 ⑲ 発 明 者 曾 我 令 北海道白老郡白老町緑町703-2 旭化成工業株式会社内
 ⑲ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
 ⑲ 代 理 人 弁理士 清 水 猛 外1名

明 細 書

1 発明の名称

新規DNA化合物

リンCアセチルエステラーゼ遺伝子を含むDNA断片に関する。

(従来の技術)

2 特許請求の範囲

(1) アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子を含むDNA断片。

(2) 第1図に示す制限酵素地図により規定される請求項1記載のDNA断片。

(3) 第1図における下線部の塩基配列が第2図で示される請求項2記載のDNA断片。

(4) 請求項1, 2, 3記載のDNA断片をベクターに組み込んだ組換え体DNA。

セファロスポリンCは、糸状菌であるアクレモニウム・クリソゲナムを用いた発酵法により製造されている。また、セファロスポリンC発酵中にセファロスポリンCの一部もしくは全部がアクレモニウム・クリソゲナムが精製するセファロスポリンCアセチルエステラーゼによって酵素的に脱アセチル化されデアセチルセファロスポリンCとなることが報告されている(Fujisawa ら、Nature(1973) 246, 154-155、Nueschら、Genetics of industrial microorganisms: proceedings of the second international symposium 1974. (1976) pp451-472)。しかし、該セファロスポリンCアセチルエステラーゼに関する従来の知見は、部分的な精製に留まっていた(Hinnen ら、Antimicrob. Agents Chemother (1976) 9, 824-830)、今日ま

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来であり、セファロスポリンCをデアセチルセファロスポリンCに変換する酵素であるセファロスポ

で該酵素の純化ならびに該酵素遺伝子の単離の報告はない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼをコードするDNA化合物を提供することを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼについて鋭意研究を重ねた結果、該酵素を純化し、該酵素のアミノ酸配列の一部を決定し、そのアミノ酸配列の常法を基に該酵素をコードするDNA化合物を単離し、その塩基配列を決定し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、

(1)アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子を含むDNA断片

(3) (2)で得たセファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、該酵素バンドを切り出し、抽出する。以上により純品セファロスポリンCアセチルエステラーゼを得ることができる。

(4) (3)で得た純化セファロスポリンCアセチルエステラーゼをトリブシン消化する。

(5) (4)で得た分解ペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離する。

(6) (3)で得た純品セファロスポリンCアセチルエステラーゼ、(5)で得たペプチド断片のアミノ酸配列を決定する。

以上により、セファロスポリンCアセチルエステラーゼN末端アミノ酸配列、および下記3種のアミノ酸断片が該酵素に含まれることが判った。

1. X-Leu-X-Asp-Ser-Lys-Leu-Ala-Tyr (N末端)
2. Leu-Asn-Asp-Lys-Gly-Phe-Asp-Ala
3. Gly-Asn-Leu-Ile-Gly-Asn-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp

(2)第1図に示す制限酵素地図により規定される上記(1)記載のDNA断片

(3)第1図における下線部の塩基配列が第2図で示される上記(2)記載のDNA断片

(4)上記(1)、(2)、(3)記載のDNA断片をベクターに組み込んだ組換え体DNAを提供するものである。

本発明に係るDNAおよび組換え体微生物は、おおよそ下記の工程によって造成することができる。

1. セファロスポリンCアセチルエステラーゼの部分アミノ酸配列の決定

(1) アクレモニウム・クリソゲナムの培養液上澄を硫酸アンモニウム沈殿法により濃縮する。

(2) (1)で得た濃縮液を弱塩基性陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過、弱塩基性陰イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィーの4つのクロマトグラフィーに供する。

4. His-Thr-Ala-Asn-Asp-Ala-Ser-Val-Glu-Asn
X:不明

(酵素活性測定法)

セファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性はセファロスポリンCを基質として反応を行い、生成するデアセチルセファロスポリンCを高速液体クロマトグラフィーで定量し、その生成量から活性を算出して行う。すなわち、48mMセファロスポリンCを含む0.2Mリン酸カリウムバッファー(pH7.0)1ml中に0.001~0.01Uの酵素存在下で実施し、25℃で60分間反応を行う。1mlのメタノールを添加して直ちに氷冷して反応を停止し、10000×g 2分間遠心分離し、上清中に生成するデアセチルセファロスポリンCを、下記の条件で高速液体クロマトグラフィーによって分析を行う。

高速液体クロマトグラフィー分析条件は、カラムはZORBAX-BPNH2カラム(デュボン社、4.5mm×25cm)、移動相は8%酢酸-4

%メタノール-12%アセトニトリル-76%水、流速は1.5~2.0 ml/分、検出波長は254 nmとする。

(タンパク質濃度測定法)

タンパク質濃度の測定は、牛血清アルブミンを標準として用い、ブラッドフォード (Bradford, M.M., Anal. Biochem. (1976) 72, 248-254) の方法にしたがって測定する。

(アミノ酸配列決定法)

アミノ酸配列の解析は、純化ペプチド断片を通常の条件でエドマン分解反応を行い、各サイクルで得られるアミノ酸フェニルチオヒダントイン誘導体を定量することによって求める。

アミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体の定量には、カラムとしてPTH-C18 (アプライド バイオシステム社) を用い、検出は波長269 nmで行う。

的遺伝子を位置づけ、それをプラスミドベクターにサブクローニングする。

(6) かくして得られたDNA断片の塩基配列を決定し、既知のアミノ酸配列との比較によりセファロsporin CアセチルエステラーゼゲノムDNAの存在を確認する。

(7) セファロsporin Cアセチルエステラーゼの全コード領域を含む適当な大きさのDNA断片 (該遺伝子のプロモーター、ターミネーター等の領域も含むことが推定される断片) をアクレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターに組み込んで、組換え体DNAを作製する。

(8) 上記組換え体DNAを用いて、アクレモニウム・クリソゲナムを形質転換する。

(9) 上記(8)により得られた形質転換体のセファロsporin Cアセチルエステラーゼ活性もしくは類似化合物を基質としたエステラーゼ活性を測定し、(7)でベクターに組み込んだDNA断片を導入することにより、酵素活性が上昇することを確認する。

II. セファロsporin Cアセチルエステラーゼ遺伝子の単離

(1) アクレモニウム・クリソゲナムから染色体DNAを抽出し、適当な制限酵素 (例えば Hbol 等) で部分切断する。

(2) (1)で得られたDNA断片を適当なファージベクター (例えば EMBL3, EMBL4 等) に組み込み、アクレモニウム・クリソゲナムの染色体DNAライブラリーを構築する。

(3) 上記セファロsporin CアセチルエステラーゼN末端、もしくはトリプシン分解ペプチドのアミノ酸配列をコードし得る塩基配列をもつDNAオリゴマーを合成する。

(4) (2)で得たライブラリーの中から、(3)で得たDNAオリゴマーをプローブとしたブランクハイブリダイゼーションにより、目的とするファージを選択分離する。

(5) 選択したファージからDNAを抽出し、同上のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、適当なサイズの制限酵素断片上に目

上記の工程中でDNA、組換え体宿主としての大腸菌等の取り扱いに必要な一般的な操作は、当業者間で通常行われているものであり、例えば、Maniatisらの実験操作書 (T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 1989) にしたがえば、容易に実施できる。使用される酵素、試薬類もすべて市販の製品を用いることができ、特に断らない限り、製品で指定されている使用条件にしたがえば、完全にそれらの目的を達成することができる。

例えば、上記(1)において、DNA抽出源としては、アクレモニウム・クリソゲナム11550、アクレモニウム・クリソゲナムIS-5等の菌株が使用できる。

なお、アクレモニウム・クリソゲナムIS-5株は、平成2年2月5日付で通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第11232号の寄託番号で寄託されている。

また、該菌からの全DNA抽出は、例えば、

Johnstone ら (Johnstone et.al., EMBO Journal (1985) 4, 1307-1311) の方法、もしくは Minuth ら (Minuth et.al., Current Genetics (1982) 5, 227-231) の方法に準じて行うことができる。

上記(3)において、DNAオリゴマーの合成は、市販のDNA合成機を用い、その操作手順にしたがって実施することができる。上記(6)におけるDNA塩基配列の決定法も、公知であるジデオキシ法 (Sanger et.al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1977) 73, 5463) を用いることができる。上記(7)におけるアクレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターとしては、例えば、pPGKM5, pACTHY83, pEGAP83 (特願平2-166566号) 等を使用することができる。また、(8)におけるアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換は、例えば、Queener らの方法 (Queener et al: Microbiology 1985, American Society for Microbiology (1985) pp468-472) あるいは Isogai らの方法 (Isogai et al: Agric.

ム 0.5 g / リン酸水素二カリウム 0.5 g / 塩化カリウム 0.5 g / 硫酸マグネシウム (7水塩) 0.5 g / 硫酸鉄 (II) (7水塩) 0.01 g / 硝酸ナトリウム 3 g / イーストエキストラクト 4 g / ペプトン 10 g を水 1 l に溶解したもの。

CM 固形培地: 1.5% の寒天を含有する CM 培地。

GAG 培地: グリセロール 40 g / アスパラギン 4 g / 塩化カルシウム 0.1 g / 塩化ナトリウム 0.1 g / 微量金属溶液 (硫酸マグネシウム (7水塩) 4 g / 硫酸鉄 (II) (7水塩) 0.4 g / 硫酸マンガン (4水塩) 0.16 g / 硫酸亜鉛 (7水塩) 0.4 g / 無水硫酸銅 0.04 g を水 1 l に溶解したもの) 25 ml / 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) 30 ml を水 1 l に含有する培地。

P-バッファー: 0.6 M 塩化カリウム / 0.01 M 塩化マグネシウム / 0.025 M 塩化カルシウム。

Biol.Chem (1987) 51, 2321-2329) に準じて実施することができる。

(実施例)

以下、実施例により本発明を詳述するが、本発明は、該実施例によって限定されるものではない。なお、実施例に記載の略称ないし略号は、以下のとおりである。

マニアティスの実験書: (T.Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982)

N-3 シード培地: コーンスティープリカー 40 g / ビート 20 g / 酢酸アンモニウム 2 g / スイートス 40 g を水 1 l に溶解したもの。

メイン培地: ビート 30 g / 脱脂大豆 40 g / コーンスティープリカー 10 g / 酢酸アンモニウム 5 g / 硫酸アンモニウム 7 g / 硫酸カルシウム 8 g / 炭酸カルシウム 15 g / スイートス 60 g / メチルオレイト 41.5 g を水 1 l に含むもの。

CM 培地: ショ糖 20 g / リン酸二水素カリウ

PEG 溶液: 25% ポリエチレングリコール (約 4000) / 0.01 M トリス (pH 8.0) / 0.05 M 塩化カルシウム / 0.6 M 塩化カリウム。

6×SET: 0.9 M NaCl / 0.12 M Tris-Cl (pH 7.8) / 6 mM EDTA

6×SSC: 0.9 M NaCl / 0.09 M クエン酸 3 ナトリウム

5×デンハルツ: 0.1% フィコール / 0.1% ポリビニルピロリドン / 0.1% 牛血清アルブミン

実施例 1

アクレモニウム・クリソゲナムの培養

アクレモニウム・クリソゲナムの培養は、20 l のジャーフェンター (丸菱社) 中 15 l の下記培地を入れて、25℃で168時間培養した。

培養した菌液 6000 g を 10 分間遠心分離し、セファロsporin C アセチルエステラーゼ活性の

ある上清画分を回収した。

培地：シュクロース2%、炭酸カルシウム0.5%、硫酸カルシウム1.25%、酢酸アンモニウム0.8%、コーンスターチ3%、ビートモラセス5%、脱脂大豆6%、メチルオレート3% (pH 6.4)

実施例2

酵素の精製

セファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性を持つ培養液上清画分10ℓを、3mMジチオスレイトール存在下50mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 系にした。以下の操作はすべて5℃以下で行った。

上記酵素液を6000×gで10分間遠心分離し、上清を回収し、粗酵素液とした。粗酵素液は総タンパク質67000mg、総活性12Uであった。

粗酵素液に30%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間攪拌し、6000×gで

30%飽和硫酸アンモニウムを含むPD溶液で平衡化させたフェニルセファロースCL-4Bカラム (3.1cm×23cm、ファルマシア社) に、上記セファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性画分を吸着させ、PD溶液中硫酸アンモニウム30~0%およびエチレングリコール0~70%のリニアグラジエント (総容量1700ml) で溶離した。流速は2.5ml/分で行った。回収された活性画分は総タンパク質690mg、総活性6.0Uであった。

回収されたセファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性画分をセントリプレッ10 (アミコン社) にて25mlまで濃縮し、得られた濃縮液を、予めPD溶液で平衡化したセファクリルS-200SFカラム (3.0cm×75cm、ファルマシア社) に5ml充填して、流速1.3mlでゲル濾過を行った。上記の操作を5回繰り返し、総タンパク質58mg、総活性4.0Uのエステラーゼ画分を得た。

上記のエステラーゼ画分をセントリプレッ1

1時間遠心分離し、その上清を回収した。回収液にさらに硫酸アンモニウムを加え、70%飽和硫酸アンモニウムとして30分間攪拌し、6000×gで1時間遠心分離した。遠心分離後、上清を除いた沈澱を360mlの50mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.0)、3mMジチオスレイトール (以下、PD溶液と呼ぶ) に懸濁して、これをPD溶液に対して36時間透析した。得られた透析液の2分の1量を、予めPD溶液で平衡化しておいたDEAE-セファロースCL-6Bカラム (4.1cm×37.5cm、ファルマシア社) に吸着させ、PD溶液中0~0.6Mの塩化ナトリウムリニアグラジエント (総量2500ml) で溶離した。流速は、3.3ml/分で行った。セファロスポリンCアセチルエステラーゼは塩化ナトリウム0.30~0.35Mの間で溶出した。上記の操作を2回繰り返し、総タンパク質11000mg、総活性8.5Uを回収した。

回収された活性画分に硫酸アンモニウムを30%飽和になるまで加え、30分間攪拌した。予め

0 (アミコン社) にて4mlまで濃縮し、その4分の1を、予めPD溶液で平衡化させた高速液体クロマトグラフィー用カラムTSK-gel DEAE-5PW (2.1cm×15cm、東ソー社) に吸着させた。PD溶液中0~0.6Mの塩化ナトリウムリニアグラジエントにて流速2.0ml/分、総容量480mlで溶離した。上記の操作を4回繰り返し、総タンパク質2.8mg、総活性2.5Uのエステラーゼ画分を得た。

得られたエステラーゼ画分をセントリカット10 (アミコン社) にて1mlまで濃縮し、その5分の1量をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (ゲルサイズ13.8cm×13.0cm×0.2cm) に供した。泳動後、分子量29000に相当するバンドを切り出し、ゲル容量の10倍量の10mM炭酸水素アンモニウムに切り出したゲルを浸した。24時間かけて酵素を溶出し、総タンパク質0.08mg、総活性1.6Uのほぼ100%のセファロスポリンCアセチルエステラーゼを得た。精製したセファロスポリンCアセチルエ

テラーゼ10 μ gを100℃で5分間処理し、直ちに水中で急冷した後、0.5 μ gのトリプシン(約110U/略、ペーリンガー・マンハイム社)を加え、37℃で12時間反応を行った。反応液をコスモシール5C8-300(4.6mm \times 150mm)の高速液体クロマトグラフィーにかけ、分解ペプチド断片を細分した。細分、回収されたペプチド断片の内3種、および未分解セファロsporinCアセチルエステラーゼについて、そのN末端アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列を下に示す。

1. X-Leu-X-Asp-Ser-Lys-Leu-Ala-Tyr (N末端)
2. Leu-Asn-Asp-Lys-Gly-Phe-Asp-Ala
3. Gly-Asn-Leu-Ile-Gly-Asn-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Leu-Gln-Asp
4. His-Thr-Ala-Asn-Asp-Ala-Ser-Val-Glu-Asn

X:不明

実施例3

アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロ

ック社)に感染させ、出現するブランク数を計測した。その結果、この懸濁液は、 3×10^5 個の組換えファージを含有することが判明した。このファージ液をアクレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリーとし、4℃に保存した。なお、上述の供与体DNAおよびベクターの調製、そして、両者の結合等に関する詳細な方法、条件は、フリッシャッフ(Frischauf)らが記載したものを採用した(文献:ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー(J.Mol.Biol.)(1983)170,827-842)。また、DNAのラムダ粒子内への封入は、プロメガバイオテック社のパッケージングエクストラクトを用い、それに添付されたプロトコールにしたがって行った。

(2) プローブの作製

実施例2で決定されたセファロsporinCアセチルエステラーゼ中のアミノ酸配列の内、下式1および2に示したアミノ酸配列を基にDNAプローブを作製した。

スボリンCアセチルエステラーゼ遺伝子の単離
(1) アクレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリー作製

アクレモニウム・クリソゲナムIS-5株(微生物菌第11232号)の全DNAをジョンストン(I.L.Johnstone)らがアスペルギルス・ニデランスについて用いた方法(文献:EMBO 1, (1985) 4, 1307-1311)に準じて抽出した。そして、この全DNA約60 μ gをMboIで部分消化し、次いで、アルカリホスファターゼで処理した。一方、ラムダベクターEMBL3(プロメガバイオテック社)10 μ gをBamHIとEcoRIで完全に消化し、イソプロパノール沈澱により、短いEcoRI-BamHIリンカー部分を除去した。次いで、上記部分消化DNA断片約1 μ gとBamHI末端を有するベクター約2 μ gとをT4・リガーゼを用いて連結せしめ、ラムダファージ粒子内へ封入した。こうして得た組換えファージ懸濁液を適当に希釈し、エシェリシア・コリ(E. coli)NM593(プロメガバイオテ

式1. X-Leu- X -Asp-Ser-Lys-Leu-Ala-Tyr

式2. Leu-Asn-Asp-Lys-Gly-Phe-Asp-Ala

上式1中、下線を施したアミノ酸配列から推定される遺伝子上の可能なDNA塩基配列の内、これまでに塩基配列の決定されているアクレモニウム・クリソゲナム由来の遺伝子において殆ど使用されていないコドンを除いて、オリゴヌクレオチド混合物を3種に分けて合成し、EST1、EST2およびEST3と称した。EST1は18mer、128種のオリゴヌクレオチド混合物、EST2およびEST3は18mer、64種のオリゴヌクレオチド混合物で、それぞれ下記の配列を有する。

EST1:

GA(TC)TC(TC)AA(AG)CT(TCAG)GC(TCAG)TAC

EST2:

GA(TC)TCGAA(AG)CT(TCAG)GC(TCAG)TAC

EST3:

GA(TC)AGCAA(AG)CT(TCAG)GC(TCAG)TAC

括弧内の塩基は、塩基の混合物を用いた場所を

示す。

上式2中、下線を施したアミノ酸配列から推定される遺伝子上の可能なDNA塩基配列をすべて含むオリゴヌクレオチド混合物を2種に分けて合成し、EST21およびEST22と称した。EST21およびEST22は20mer、64種のオリゴヌクレオチド混合物で、それぞれ下記の配列を有する。

EST21:

AA(TC)GA(TC)AA(AG)GG(TC)TT(TC)GA(TC)GC

EST22:

AA(TC)GA(TC)AA(AG)GG(AG)TT(TC)GA(TC)GC

括弧内の塩基は、塩基の混合物を用いた場所を示す。

上記のごとく得られたEST1、EST2、EST3、EST21、EST22を各々マニアチスの実験書に記載された方法にしたがって、T4ポリヌクレオチドキナーゼと γ - 32 P-ATPを用いてラベルし、以下に述べるハイブリダイゼーション実験に使用した。以下、上記のごとく

2P-EST3を含有する溶液を用いて、48℃で2時間行った。次いで、フィルターを6×SSC溶液中、室温で10分間洗浄し、6×SSC溶液中48℃で10分間洗浄した。次いで、インテンシファイヤー・スクリーンを用いて、-80℃で48時間オートラジオグラフィーを行った。その結果、32P-EST1、もしくは32P-EST3とハイブリダイゼーションさせたものからは陽性スポットは見いだされなかったが、32P-EST2とハイブリダイゼーションさせたものから6個の陽性スポットが見出された。このうち、5個の陽性スポットに相応する寒天領域よりファージを抽出し、再度上記の工程にしたがってブランクハイブリダイゼーションを行い、5個の純化ポジティブファージクローンを得た。これらのクローンをそれぞれ λ ESTC1、 λ ESTC2、 λ ESTC3、 λ ESTC4、 λ ESTC5と命名した。

ベルされたプローブを32P-EST1、32P-EST2、32P-EST3、32P-EST21、32P-EST22と称する。

(3) ハイブリダイゼーションによるスクリーニング

(1)で得られたファージ液(DNAライブラリー)の一部をLE392に感染させ、9枚のプレート上に各々2600個のブランクを形成させた。これらブランクをベントン(Benton W.D.)らの方法(文献:Science(1977)196,180-182)にしたがって、ニトロセルロースフィルターに転写し、アルカリ変性、中和処理を行い、DNAを固定した後、上記(2)で得た32P-EST1、32P-EST2もしくは32P-EST3とプレート3枚分ずつハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、5×デンハルト、6×SET, 0.2%SDS, 0.1mg/ml変性サケ精子DNAおよび終濃度 1×10^5 cpm/mlで32P-EST1、32P-EST2もしくは3

(4) セファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子のサブクローニングおよびその位置の限定

(3)で得たファージクローン5種より、グロスバーガー(Grossberger)記載の方法(文献:Nucleic Acids Research(1987)15,6737)にしたがってDNAを抽出した。次いで、このラムダDNAをBglII、SalIで切断して、アガロースゲル電気泳動を行った後、32P-EST2を用いてサザンハイブリダイゼーション(方法については文献:サザン(Southern),(J.Mol. Biol.)(1975)98,503-517)を行った。なお、ハイブリダイゼーションおよびフィルター洗浄等は、(3)に記載したものと同様に行った。その結果、BglII切断物では、すべてのクローンに存在する約6.5Kbの断片のみが、SalI切断物では、すべてのクローンに存在する約1.4Kbの断片のみが該プローブとハイブリダイズすることが判明した。また、 λ ESTC1のDNAをSacI、KpnI、SmaI、BamHI、XbaI、PstIで切断してアガロースゲル電気泳動を行っ

た後、32P-EST2もしくは32P-EST21と32P-EST22の混合物を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、いずれの制限酵素切断物でも、32P-EST2を用いた場合と32P-EST21と32P-EST22の混合物を用いた場合とで、同じ大きさの断片にハイブリダイズすることが判明した。そこで、32P-EST2とハイブリダイズするBg1II切断物である約6.5Kbの断片をジーンクリーン(GENE-CLEAN™, フナコシ社販)を用いて、その添付プロトコールにしたがって、アガロースゲルから回収、精製した。一方、ベクターとして用いるpUC18は、BamHIで切断した後、アルカリホスファターゼ処理を行った。次いで、両者をT4-リガーゼにより連結し、マニアティスの実験書に記載の方法に準じて、E. Coli JM105に導入した。アンピシリン(100μg/皿)、5-ブロム-4-クロル-3-インドリル-β-ガラクトシド(0.004%)を含有するレーブロス寒天培地上に生育してきた白

判明した。

pEST101を種々の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動により解析した結果、第1図で示される6.5Kbインサートの制限酵素地図が得られた。

(5)セファロsporinCアセチルエステラーゼ遺伝子の塩基配列

上記KpnI断片を内部に含む2674bpの塩基配列をサンガーの方法に基づき決定した。塩基配列決定の具体的実験手法は、タカラ(宝酒造社)のシーケンシングキットを用いて、その添付プロトコールにしたがって行った。その結果、実施例2に示した4つのアミノ酸配列を同一フレーム内にコードし得る塩基配列が存在していることが判明した。

実施例4

pTEST4の構築

第3図に示す工程にしたがって、セファロsporin

色コロニーを6個選び、簡便法(マニアティスの実験)でプラスミドDNAを抽出し、KpnIもしくはSalI消化による解析を行い、目的の断片と同じ大きさの断片が挿入されているクローンを選択した。かくして得られたプラスミドの1つをpEST101L、その逆向きに断片が挿入されているものをpEST101Rと命名した。pEST101LのKpnI消化による解析から、pEST101Lは32P-EST2、32P-EST21および32P-EST22の混合物とハイブリダイズするλESTC1のKpnI切断物である0.7Kbの断片をふくむことが予想されたので、該断片の塩基配列をサンガーの方法に基づき決定した。塩基配列決定の具体的実験手法は、タカラ(宝酒造社)のシーケンシングキットを用いて、その添付プロトコールにしたがって行った。その結果、(2)式1、式2のアミノ酸配列を同一フレーム内にコードし得る塩基配列が存在し、また、その箇所の配列はEST2中の1種およびEST21中の1種と一致していることが

リンCアセチルエステラーゼ遺伝子の付加コピーをアクレモニウム・クリソゲナムに導入するためのプラスミドpTEST4を構築した。以下に該工程を説明する。まず、実施例3-(4)で得たプラスミドpEST101RをEcoRIとScaIで同時に消化した後、DNAポリメラーゼクレノウ(Klenow)断片と4種のデオキシヌクレオチド3リン酸を作用させ、切断端を平滑末端に変換した。次いで、該反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、セファロsporinCアセチルエステラーゼ遺伝子を含む約2Kbの断片をゲルから回収、精製した。該断片とSmaIで切断しアルカリホスファターゼ処理を行ったpACTHY83とを、T4-リガーゼで連結することによりpTEST4を得た。なお、上記工程において、制限酵素消化により生ずるDNA断片の分離精製、DNA断片間の結合反応、該反応により生ずるプラスミドによる大腸菌の形質転換、得られた形質転換体からのプラスミドの調製およびその解析等の基本操作は、実施例3ならびにマニアティスの

実験に記載された方法に準じて行った。また、本実施例において使用したプラスミド pACTHY83 は、アクレモニウム・クリソゲナム内で機能しうるハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ発現単位（アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子のプロモーターおよびターミネーター、細菌由来のハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子が発現に好適な配置で結合した発現単位）を有するアクレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターであり、その造法は、特願平2-166566号に記載されている。

実施例5

pTATF1によるアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換

pTEST4をアクレモニウム・クリソゲナムIS-5株に導入することにより、エステラーゼ活性が強化された形質転換体を取得した。以下にその詳細を説明する。

(1) プロトプラストの調製

液を3000 r.p.m.で5分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた後、P-バッファで1回洗浄し、プロトプラストが 3×10^8 個/μlの濃度となるようにP-バッファに懸濁した。

(2) pTEST4によるプロトプラスト形質転換

上記(1)で得たプロトプラスト懸濁液0.1 μlに、pTEST4を10 μg含む溶液10 μlを加えた後、0.05 μlのPEG溶液を加え、かるく混合した。該混合液を氷上に25分間静置した後、同上のPEG溶液を1 μl加えて、室温でさらに30分間静置した。

かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0.2 μlずつ、プロトプラスト再生培地に（文献（イソガイら：Agric. Biol. Chem. 1987, 51, 2321-2329）に記載されているBRM培地）を25 μl含有するプレート上に広げ、15℃で20時間培養した。次いで、該プレートに4.5 mgのハイグロマイシンBを含み、50℃に保温した同

CM固形培地上で30℃5日間生育させたアクレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をCM培地50 μlに接種し、回転式振とう機（250 r.p.m.）上、30℃で3日間培養した。さらに、該菌液1 μlを50 μlのGAG培地に接種して、30℃で20時間培養した。得られた培養液50 μlを3500 r.p.m.で10分間遠心し、菌糸体を沈澱させた後、0.9%のNaCl溶液で洗浄した。0.01 Mジチオスレイトールを含んだマクイルベイン緩衝液（0.1 Mクエン酸、0.2 Mリン酸ナトリウム、pH 7.3）20 μlに懸濁し、30℃で1時間、おだやかに振とうした。次いで、菌糸体を3200 r.p.m. 10分間の遠心で沈澱させ、P-バッファで洗浄した後、ノボザイム（Novo社）を10 mg/μlの濃度で含有するP-バッファ10 μlに懸濁し、30℃で1時間おだやかに振とうした。該反応液を800 r.p.m.で30秒間遠心して得た上清を、濾紙（TOYO FILTER PAPER 5A）を用いて濾過することにより、菌糸体とプロトプラストを分離した。次いで、該濾

上のBRM培地5 μlを重層した後、28℃で14日間培養した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体（以下、HYB形質転換体と略す）が70株出現した。

(3) エステラーゼ活性の検出

セファロsporin Cアセチルエステラーゼはアクレモニウム・クリソゲナム培養液上清に存在するが、同上清には該酵素の基質であるセファロsporin C、および生成物であるデアセチルセファロsporin Cが存在するために、両化合物を除去することなしに直接セファロsporin Cアセチルエステラーゼ活性を測定することは困難である。また、該酵素はセファロsporin Cの類似化合物であるセファロチンにも作用し、デアセチルセファロチンを生成する。したがって、セファロチンを基質としたエステラーゼ活性を測定することにより、pTEST4による形質転換体の該酵素量増加を推定することにした。

上記(2)で得たHYB形質転換体より25株をラ

ンダムに選択し、その各々を20 μ g/mlのハイグロマイシンBを含むCM固形培地に接種し、室温で14日間培養した。その中から5株をランダムに選択し、IS-5 (TEST4) 1、IS-5 (TEST4) 2、IS-5 (TEST4) 3、IS-5 (TEST4) 4およびIS-5 (TEST4) 5と命名した。その各々と親株であるIS-5株をCM固形培地に接種し、室温で3日間培養した。その各々の生育した菌体をN-3シード培地50 mlに接種し、25℃で4日間振とう培養した(220 r.p.m.)。その各々の培養液2 mlをメイン培地30 mlに接種し、7日間振とう培養した(220 r.p.m.)。該培養液1 mlを遠心分離により菌体を除去し、培養液上清を得た。該培養液上清0.12 mlと1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 0.04 ml、100 mg/mlセファロチン0.04 mlを混合し、25℃で90分間反応させた後、メタノール0.2 mlを加えて反応を停止した。該反応液を遠心分離して得られる上清を高速液体クロマトグラフィーに供し、反応生成物であ

るデアセチルセファロチンを検出した。なお、高速液体クロマトグラフィーのカラムは、ZORBAX-BPNH2カラム(デュボン社、4.5 mm \times 25 cm)を用い、移動相としては8%酢酸-4%メタノール-12%アセトニトリル-76%水からなる溶液を用いて、流速は2 ml/分、さらに検出波長は254 nmで行った。その結果、第1表に示したように、調べた5株中4株の形質転換体由来する培養液上清には、親株由来する培養液上清に存在する2倍以上のセファロチンを基質とするエステラーゼ活性が存在していた。また、培養液上清中のセファロスポリンCとデアセチルセファロスポリンCを定量するために、培養液上清を高速液体クロマトグラフィーに供した。なお、高速液体クロマトグラフィーのカラムはZORBAX-BPNH2カラム(デュボン社、4.5 mm \times 25 cm)を用い、移動相としては4%酢酸-4%メタノール-8%アセトニトリル-84%水からなる溶液を用いて、流速は2 ml/分、さらに検出波長は254 nmで行った。その結果、第1表

に示したように、調べた5株中4株の形質転換体由来する培養液上清には、親株由来する培養液上清に存在する半分以上のセファロスポリンCしか存在しておらず、セファロチンを基質とするエステラーゼ活性が高いほどデアセチルセファロスポリンC/セファロスポリンC比も高いという関係があることが判明した。すなわち、この結果は、本発明のDNA断片を使用することにより、アクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼ活性を上昇させることが可能となることを示している。また、該結果は、上記2 KbのEcoRI-ScaI断片上にセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子のプロモーター、タンパク質コード領域ならびにターミネーターが含まれていることを示唆している。なお、反応1分間に1 μ moleのセファロスポリンCを生成する酵素量を1単位(U)と定め、培養液上清1 ml当たりの活性として第1表に示した。

第 1 表

菌 株	活 性 (μ U/ml)	CPC (mg/l)	DCPC (mg/l)	DCPC/CPC
IS-5	7.1	858	2404	2.8
IS-5	7.3	891	2683	3.0
IS-5(TEST4)1	22.3	529	6093	11.5
IS-5(TEST4)2	38.7	280	3368	12.0
IS-5(TEST4)3	24.1	405	3274	8.1
IS-5(TEST4)4	7.9	721	3258	4.5
IS-5(TEST4)5	41.5	230	4464	19.4

活性はセファロチンを基質としたエステラーゼ活性

(発明の効果)

実施例に開示したとおり、本発明のDNA断片を利用することにより、セファロスポリンCをデアセチルセファロスポリンCに変換する反応を触媒する酵素であるセファロスポリンCアセチルエステラーゼの合成能が高まった新規アクレモニウ

ム・クリソゲナムを創製することが可能となった。該アクレモニウム・クリソゲナムを使用することにより、デアセチルセファロスポリンC発酵生産の収率向上が期待できる。また、本発明のDNA断片を利用してアクレモニウム・クリソゲナム内に存在するセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子を破壊することにより、デアセチルセファロスポリンCと共にセファロスポリン系抗生物質の重要な出発原料となっているセファロスポリンCを効率よく生産しうる新規アクレモニウム・クリソゲナムを創製することが可能となる。また、本発明のDNA断片に含まれるセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子のプロモーターならびにターミネーター部分は、アクレモニウム・クリソゲナム用発現ベクターの構成要素として利用することができる。

4 図面の簡単な説明

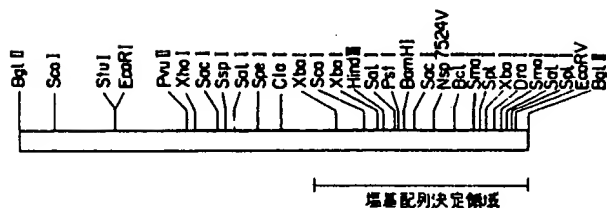
第1図はアクレモニウム・クリソゲナム由来のセファロスポリンCアセチルエステラーゼ遺伝子

を含むDNA断片の制限酵素地図、第2図は第1図における下線部の領域の塩基配列を示し、第3図はセ・ファロスポリリンCアセチルエステラーゼ遺伝子の付加コピーをアクレモニウム・クリソゲナムに導入するためのプラスミドpTEST4の構築方法を示す説明図である。

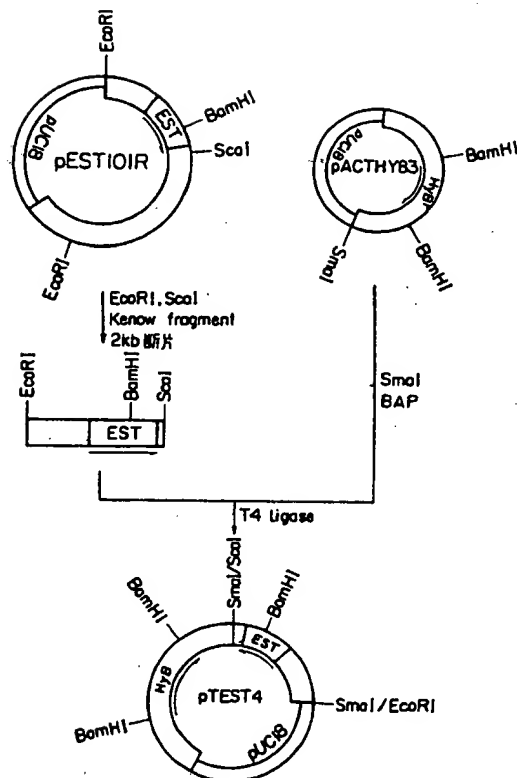
代理人 清水

(ほか1名)

第 1 圖



第3図



(a)

[illegible]

(b)

[illegible]